

375L0084

N:o L 32/26

EUROOPAN YHTEISÖJEN VIRALLINEN LEHTI

5.2.75

KUODES KOMISSION DIREKTIIVI,

annettu 20 päivänä joulukuuta 1974,

yhteisön määrittämenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten

(75/84/ETY)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan talousyhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon yhteisön näytteenotto- ja määrittämenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 20 päivänä heinäkuuta 1970 annetun neuvoston direktiivin⁽¹⁾, sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna uusien jäsenvaltioiden Euroopan talousyhteisöön ja Euroopan ydinenergia-yhteisöön liittymisestä Brysselissä 22 päivänä tammikuuta 1972⁽²⁾ allekirjoitettuun sopimukseen liitetyllä asiakirjalla⁽³⁾,

sekä katsoo, että

mainitussa direktiivissä säädetään rehujen virallisen tarkastuksen suorittamisesta yhteisön näytteenotto- ja määrittämenetelmiä käyttäen sen todentamiseksi, että lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten rehujen laatua ja koostumusta koskevat vaatimukset tulevat täytetyksi,

useita yhteisön määrittämenetelmiä on jo vahvistettu 15 päivänä kesäkuuta 1971 annetulla komission direktiivillä 71/250/ETY⁽⁴⁾, 18 päivänä marraskuuta 1971 annetulla komission direktiivillä 71/393/ETY⁽⁵⁾, 27 päivänä huhtikuuta 1972 annetulla komission direktiivillä 72/199/ETY⁽⁶⁾, 5 päivänä joulukuuta 1972 annetulla komission direktiivillä 73/46/ETY⁽⁷⁾ ja 25 päivänä maaliskuuta 1974 annetulla komission direktiivillä 74/203/ETY⁽⁸⁾; työ on tämän jälkeen edistynyt siinä määrin, että olisi hyväk-

syttävä kuudes ryhmä menetelmiä, ja tässä direktiivissä säädetty toimenpiteet ovat pysyvän rehukomitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

1 artikla

Jäsenvaltioiden on vaadittava, että rehujen virallisessa tarkastuksessa käytettävät bukinolaatin, sulfakinoksalii-nin ja furatsolidonin pitoisuudet määritetään tämän direktiivin liitteessä esitettyjen menetelmien mukaisesti.

Tämän direktiivin liitteessä esitettyihin menetelmiin sovellettava 15 päivänä kesäkuuta 1971 annetun ensimmäisen komission direktiivin 71/250/ETY liitteessä olevan 1 osan (Johdanto) yleisiä määräyksiä, lukuun ottamatta näytteen esikäsittelyä koskevia määräyksiä.

2 artikla

Jäsenvaltioiden on saatettava tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät lait, asetukset ja hallinnolliset määräykset voimaan viimeistään 1 päivänä marraskuuta 1975. Niiden on ilmoitettava tästä komissiolle viipymättä.

3 artikla

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 20 päivänä joulukuuta 1974.

Komission puolesta

Puheenjohtaja

Francois-Xavier ORTOLI

⁽¹⁾ EYVL N:o L 170, 3.8.1970, s. 2

⁽²⁾ EYVL N:o L 73, 27.3.1972, s. 14

⁽³⁾ EYVL N:o L 73, 27.3.1972, s. 5

⁽⁴⁾ EYVL N:o L 155, 12.7.1971, s. 13

⁽⁵⁾ EYVL N:o L 279, 20.12.1971, s. 7

⁽⁶⁾ EYVL N:o L 123, 29.5.1972, s. 6

⁽⁷⁾ EYVL N:o L 83, 30.3.1973, s. 21

⁽⁸⁾ EYVL N:o L 108, 22.4.1974, s. 7

LIITE

1. BUKINOLAATIN MÄÄRITTÄMINEN

(etyyli-4-hydroksi-6,7-di-isobutoksi-3-kinoliinikarboksylaatti)

1 arkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä on mahdollista määrittää bukinolaatin pitoisuus rehuissa, konsentraateissa ja esiseoksissa. Määrityksen alaraja on 10 mg/kg. Dekokinaatti häiritsee määrittämistä.

2 Periaate

Näyte uutetaan kloroformilla: uute haihdutetaan kuivaksi, jäännös liuotetaan kloroformiin ja erotetaan ohutlevykromatografisesti. Bukinolaatti uutetaan etanolilla ja määritetään spektrofotometrisesti vertaamalla standardiliuoksiin.

3 Reagenssit

3.1 Kloroformi, analyysilaatua.

3.2 96 % (v/v) etanoli, analyysilaatua.

3.3 Kloroformin ja etanolin seos: sekoitetaan keskenään 10 tilavuusosaa kloroformia (3.1) ja yksi tilavuusosa etanolia (3.2).

3.4 80 % (v/v) etanoli, analyysilaatua.

3.5 Silikageeli G, ohutlevykromatografiaa varten.

3.6 Standardiyhdiste: puhdas bukinolaatti.

3.7 Standardiliuokset:

3.7.1 Bukinolaatin standardiliuos, 0,2 mg/ml: punnitaan 0,1 mg:n tarkkuudella 50 mg standardiainetta (3.6). Liuotetaan kloroformiin (3.1) 250 ml:n mittapullossa lämmittämällä vesihautteella 50 °C:ssa. Annetaan jäähtyä huoneenlämpöiseksi, täytetään merkkiin kloroformilla (3.1) ja homogenoidaan.

3.7.2 Käyttöstandardiliuokset: pipetoidaan 5, 10, 15, 20 ja 25 ml liuosta (3.7.1) 25 ml:n mittapulloihin. Täytetään merkkiin kloroformilla (3.1) ja homogenoidaan. Valmistetaan välittömästi ennen käyttöä. Nämä liuokset sisältävät vastaavasti 0,04, 0,08, 0,12, 0,16 ja 0,20 mg bukinolaattia millilitrassa.

4 Välineistö

4.1 Hiostulpallisia 50 ja 250 ml:n erlenmeyerkolveja.

4.2 Ravistelija.

4.3 Sentrifugi, johon sopii hiostulpalliset 15 ml:n putket.

4.4 Vesihauhe, säädetty 50 °C:een.

4.5 Ohutlevykromatografiavälineet.

4.6 Ohutlevykromatografiassa käytettävät lasilevyt, 200 x 200 mm, käsitellään seuraavasti. Levyille levitetään tasainen 0,5 mm:n paksuinen kerros silikageeli G:tä (3.5) ja annetaan kuivua 15 minuuttia. Levyjä pidetään kuivauskaapissa (4.11) kaksi tuntia ja siirretään sitten silikageeliä sisältävään eksikaattoriin. Valmiina hankittavat levyt ovat myös käyttökelpoisia, mikäli niillä saadaan samanlaisia tuloksia kuin edellä esitetyillä levyillä.

4.7 0,5 ml:n mikropipettejä.

4.8 Ohutlevykromatografian vyöhykkeiden talteenotto-laite.

- 4.9 Lyhyellä aallonpituusalueella toimiva ultraviolettilamppu.
- 4.10 Spektrofotofluorometri, jossa on ksenonlamppu ja kaksi monokromaattoria.
- 4.11 Kuivauskaappi, jossa on tuuletin ja joka on säädetty 100 °C:een.
- 4.12 Pyöröhaihdutin ja 250 ml:n keittopullo.

5 Menettely

5.1 Näytteen valmistus

Näyte jauhetaan niin, että se läpäisee kokonaisuudessaan 1 mm:n seulan (ISO R 565:n suosituksen mukainen).

5.2 Utto

Punnitaan hienoksi jauhettua ja homogenoitua näytettä milligramman tarkkuudella sellainen määrä, että se sisältää noin 1,25 mg bukinolaattia. Analysoitava näyte siirretään 250 ml:n erlenmeyerkolviin (4.1) ja lisätään 100 ml kloroformia (3.1). Sekoitetaan, pullo suljetaan tulpalla, ja ravistellaan tunnin ajan ravistelijalla (4.2). Dekantoidaan, suodatetaan ja suodoksesta heitetään pois ensimmäiset millilitrat.

Siirretään 80 ml kirkasta suodosta 150 ml:n dekantterilasiin tai 250 ml:n keittopulloon, joka on kiinnitetty pyöröhaihduttajaan (4.12). Haihdutetaan miltei kuiviin vesihauteella (4.4), öljymäinen jäännös liuotetaan käyttäen toistuvasti muutamia millilitroja kloroformia (3.1) ja siirretään kvantitatiivisesti 10 ml:n mittapulloon ohutkaulaista suppiloa käyttäen. Täytetään merkkiin kloroformilla (3.1) ja homogenoidaan. Mikäli liuos ei ole kirkas, sentrifugoidaan 3 minuuttia nopeudella 3 000 kierr./min. tulpallisessa putkessa.

5.3 Ohutlevykromatografia

Mikropipetillä (4.7) pipetoidaan täplinä kromatografialevyille 2 cm:n päähän toisistaan 5.2 kohdassa saatua uutetta 0,25 ml ja viittä käyttöstandardiliuosta (3.7.2).

Levy kehitetään kloroformilla (3.1) kunnes liuotinrintama on käytännössä saavuttanut levyn yläreunan, jonka jälkeen se kuivataan ilmavirrassa. Levy kehitetään kloroformi-etanoli-seoksella (3.3) kunnes liuotinrintama on kulkenut noin 12 cm. Liuottimien annetaan haihtua. Kromatogrammiin kohdistetaan ultraviolettivalo (4.9) ja bukinolaattitäplän (Rf-arvo 0,4–0,6) värin rajat merkitään neulalla.

5.4 Eluointi

Silikageeli otetaan kultakin merkityltä vyöhykkeeltä talteen käyttäen vyöhykkeen keräyslaitetta (4.8) ja siirretään sentrifugiputkeen (4.3). Kuhunkin putkeen lisätään 10 ml etanolia (3.4), ravistellaan 20 minuuttia ja sentrifugoidaan viisi minuuttia nopeudella 3 000 kierr./min. Kirkkaat liuokset dekantoidaan 50 ml:n erlenmeyerkolveihin (4.1).

5.5 Fluoresenssin mittaus

Spektrofotofluorometrin (4.10) asteikko asetetaan sadaksi väkevimmistä standardiliuoksesta saadulla eluaatilla (5.4) käyttäen eksitointiin sellaista välillä 200–280 nm olevaa aallonpituutta, joka antaa voimakkaimman fluoresenssin, ja emissioaallonpituutena 375 nm.

Muiden eluaattien (5.4) fluoresenssi mitataan näissä olosuhteissa. Saaduista arvoista määritetään bukinolaatin määrä (A) milligrammoina 10 ml:ssa näytteestä saatua eluaattia.

6 Tulosten laskeminen

Näytteen bukinolaattipitoisuus milligrammoina kilogrammaa kohti saadaan kaavasta:

$$\frac{A}{P} \cdot 50\,000$$

jossa: A = spektrofotofluorometrisellä mittauksella saatu bukinolaatin määrä milligrammoina.

P = näytteen punnitus grammoina,

7 Toistettavuus

Samasta näytteestä tehtyjen kahden rinnakkaisen määrittelyn tulosten ero ei saa ylittää:

50 %, suhteessa suurempaan tulokseen, bukinolaattipitoisuuksien ollessa välillä 10–20 mg/kg;

10 mg/kg, absoluuttisesti ilmoitettuna, pitoisuuksien ollessa välillä 20–100 mg/kg;

10 % suhteessa suurempaan tulokseen, pitoisuuksien ollessa välillä 100–5 000 mg/kg;

500 mg/kg, absoluuttisesti ilmoitettuna, pitoisuuksien ollessa välillä 5 000–10 000 mg/kg;

5 %, suhteessa suurempaan tulokseen, yli 10 000 mg/kg pitoisuuksilla.

2. SULFAKINOKSALIININ MÄÄRITYS

[(2–4-aminobentseenisulfonamido)kinoksaliini]

1 Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä on mahdollista määrittää sulfakinoksaliinin pitoisuus rehuissa, konsentraateissa ja esiseoksissa. Määrittelyn alaraja on 20 mg/kg. Muut sulfonamidit ja arsaniilihappo häiritsevät määrittelyä.

2 Periaate

Näyte uutetaan dimetyyliformamidilla ja kloroformilla. Sulfakinoksaliini hydrolysoidaan emäksisessä liuoksessa. Neutraloinnin jälkeen muodostunut aminojohdannainen diatsotoidaan ja se liitetään N-2-aminoetyyli-1-naftyyliamiiniin. Liuoksen absorbanssi mitataan 545 nm:ssä.

3 Reagenssit

3.1 N,N-dimetyyliformamidi, analyysilaatua.

3.2 Kloroformi, analyysilaatua.

3.3 Absoluuttinen etanoli.

3.4 Emäksinen suolavesi: liuotetaan veteen 10 g natriumhydroksidia analyysilaatua ja 25 g natriumkloridia analyysilaatua. Täytetään vedellä 500 ml:ksi ja homogenoidaan.

3.5 Väkevä kloorivetyhappo, analyysilaatua, tiheys 1,18.

3.6 0,1 % (w/v) natriumnitriittiliuos: 100 mg natriumnitriittiä analyysilaatua liuotetaan veteen, täytetään 100 ml:ksi vedellä ja homogenoidaan. Valmistetaan välittömästi ennen käyttöä.

3.7 0,5 % (w/v) ammoniumsulfamaattiliuos: 500 mg ammoniumsulfamaattia analyysilaatua liuotetaan veteen, täytetään 100 ml:ksi vedellä ja homogenoidaan. Valmistetaan välittömästi ennen käyttöä.

3.8 0,1 % (w/v) N-2-aminoetyyli-1-naftyyliamiinidihydrokloridiliuos: 100 mg N-2-aminoetyyli-1-naftyyliamiinidihydrokloridia analyysilaatua liuotetaan 0,1 % (v/v) kloorivetyhappoon analyysilaatua; täytetään 100 ml:ksi samalla hapolla ja homogenoidaan. Valmistetaan välittömästi ennen käyttöä.

3.9 Standardiyhdiste: puhdas sulfakinoksaliini.

3.10 Standardiliuos: punnitaan 0,1 mg:n tarkkuudella 250 mg standardiyhdistettä (3.9.). Liuotetaan 50 ml:aan natriumhydroksidiliuosta (25 ml 0,1 N natriumhydroksidiliuosta + 25 ml vettä), täytetään 500 ml:ksi vedellä ja homogenoidaan. Laimennetaan 5 ml 100 ml:ksi vedellä. Millilitra tätä liuosta sisältää 25 µg sulfakinoksaliinia.

4 Välineistö

4.1 250 ml:n hiostulpallisia erlenmeyerkolveja.

4.2 Ravistelija.

4.3 Suodatinupokas, huokoskoko 3, läpimitta 80 mm, ja imupullo.

4.4 250 ml:n erotussupiloita.

- 4.5 50, 100, 250 ja 500 ml:n mittapulloja.
- 4.6 Koeputkia, 150 mm x 25 mm.
- 4.7 Höyryhaude.
- 4.8 Spektrofotometri ja 20 mm:n kyvetit.

5 Menettely

5.1 Näytteen valmistus

Näyte jauhetaan niin, että se läpäisee kokonaisuudessaan 1 mm:n seulan (ISO R 565:n suosituksen mukainen).

5.2 Utto

Punnitaan hienoksi jauhettua ja homogenoitua näytettä milligramman tarkkuudella sellainen määrä, että se sisältää 0,25–1,25 mg sulfakinoksaliinia. Analysoitava näyte siirretään 250 ml:n erlenmeyerkolviin (4.1) ja lisätään 20 ml N,N-dimetyyliformamidia (3.1). Sekoitetaan ja kuumentetaan kolvia höyryhauteella (4.7) 20 minuuttia. Annetaan jäähtyä juoksevassa kylmässä vedessä. Lisätään 60 ml kloroformia (3.2), kolvi suljetaan ja sitä ravistellaan 30 minuuttia ravistelijassa (4.2).

Neste suodatetaan suodatinupokkaan läpi (4.3) lievää imua käyttäen. Imupullo huuhdotaan neljä kertaa 5 ml:lla kloroformia (3.2) ja huuhteluliukset kaadetaan upokkaalle ja annetaan imeytyä sen läpi. Suodos siirretään erotussuppiloon (4.4), imupullo huuhdotaan noin 15 ml:lla kloroformia (3.2) ja huuhteluliukset siirretään erotussuppiloon.

5.3 Hydrolyysi

Erotussuppiloon lisätään 50 ml emäksistä suolaliuosta (3.4) ja 5 ml etanolia (3.3). Kerrokset sekoitetaan perusteellisesti välttämällä emulsion muodostumista joko kääntämällä suppilo ylösalaisin noin 20 kertaa tai pyörittämällä sitä poistoputken ja tulpan kautta kulkevan vaaka-akselin ympäri. Kerroksien annetaan erottua (erottuminen tapahtuu tavallisesti täydellisesti noin 15 minuutin aikana).

Yläkerros (vesipitoinen kerros) siirretään 250 ml:n mittapulloon (4.5). Kloroformikerroksen utto toistetaan vielä kolme kertaa 50 ml:lla emäksistä suolavettä (3.4) ja kukin vesipitoinen erä lisätään mittapullon sisältöön. Täytetään merkkiin vedellä ja homogenoidaan.

Siirretään 25 ml tätä liuosta 50 ml:n mittapulloon (4.5), lisätään 5 ml kloorivetyhappoa (3.5), täytetään merkkiin vedellä ja homogenoidaan. Tarvittaessa suodatetaan ja ensimmäiset 15 ml suodosta heitetään pois. Tästä liuksesta otetut 10 ml:n erät siirretään kahteen koeputkeen (4.6), A ja B.

5.4 Värin kehitys ja absorbanssin mittaus

Kuhunkin koeputkeen lisätään 2 ml natriumnitriittiliuosta (3.6), sekoitetaan ja annetaan seistä kolme minuuttia. Lisätään 2 ml ammoniumsulfamaattiliuosta (3.7), sekoitetaan ja annetaan seistä kaksi minuuttia. Lisätään 1 ml N-2-aminoetyyli-1-naftyylimiiniidihydrokloridiliuosta (3.8) putkeen A ja 1 ml vettä putkeen B. Kummankin putken sisältö sekoitetaan perusteellisesti. Putkiin kiinnitettyjen kumiyhteiden avulla näihin muodostetaan vesi-imun avulla lievä alipaine liuenneen typen poistamiseksi.

Kymmenen minuutin kuluttua mitataan liuosten absorbanssit E_A ja E_B 545 nm:ssä spektrofotometrillä (4.8) nollanäytteenä vesi. Erotuksesta $E_A - E_B$ saadaan aiemmin valmistetun standardikäyrän (5.5) avulla näyteliuoksessa olevan sulfakinoksaliinin määrä (A).

5.5 Standardikäyrä

Pipetoidaan 100 ml:n mittapulloihin (4.5) 2, 4, 6, 8 ja 10 ml standardiliuosta (3.10), jotka vastaavat 50, 100, 150, 200 ja 250 μg :n sulfakinoksaliinimääriä. Kuhunkin pulloon lisätään 8 ml kloorivetyhappoa (3.5), pullo täytetään merkkiin vedellä ja homogenoidaan.

Kutakin liuosta pipetoidaan 10 ml koeputkiin (4.6) (nämä vastaavat 5, 10, 15, 20 ja 25 μg :n sulfakinoksaliinimääriä). Värireaktio tehdään kohdan 5.4 mukaisesti. Absorbanssit mitataan 545 nm:ssä vesi nollanäytteenä. Piirretään standardikäyrä käyttäen absorbanssiarvoja ordinaatatana ja vastaavia mikrogrammoina annettuja sulfakinoksaliinin määriä abskissana.

6 Tulosten laskeminen

Näytteen sulfakinoksaliinipitoisuus milligrammoina kirogrammaa kohti saadaan kaavasta:

$$\frac{A}{P} \cdot 50$$

jossa:

A = fotometrisellä mittauksella saatu sulfakinoksaliinin määrä mikrogrammoina

P = näytteen punnitus grammoina.

7 Toistettavuus

Samasta näytteestä tehtyjen kahden erillisen määrityksen tulosten ero ei saa ylittää:

10 mg/kg, absoluuttisesti ilmoitettuna, välillä 20–100 mg/kg olevilla sulfakinoksaliinipitoisuuksilla;

10 %, suhteessa suurempaan tulokseen, välillä 100–5 000 mg/kg olevilla pitoisuuksilla;

500 mg/kg, absoluuttisesti ilmoitettuna, välillä 5 000–10 000 mg/kg olevilla pitoisuuksilla,

5 %, suhteessa suurempaan tulokseen, yli 10 000 mg/kg olevilla pitoisuuksilla.

3. FURATSOLIDONIN MÄÄRITYS

[(3-(5-nitrofurfurylideeniamino)-oksatsolidin-2-oni)]

1 Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä on mahdollista määrittää furatsolidonin pitoisuus rehuissa, konsentraateissa ja esiseoksissa. Määrityksen alaraja on 10 mg/kg.

2 Periaate

Furatsolidoni uutetaan asetonilla, sen jälkeen kun näyte on ensin uutettu petrolietterillä rasvan poistamiseksi. Uute puhdistetaan kromatografisesti alumiinioksidipylväällä ja furatsolidoni eluoidaan asetonilla. Asetonieluaatti haihdutetaan kuiviin ja jäännös liuotetaan pentanoliin. Furatsolidoni uutetaan pentanolista vesipitoisella urealiuksella ja uutteen absorbanssi mitataan 375 nm:ssä.

3 Reagenssit

3.1 Asetoni, analyyssilaatua.

3.2 Kromatografiaan käytettävä alumiinioksidi, neutraali, 100–240 mesh, valmistetaan seuraavasti: sekoitetaan 500 g alumiinioksidia ja 1 litra kuumaa tislattua vettä ja supernatantti dekantoidaan. Tämä toimenpide tehdään kaksi kertaa ja lopuksi suodatetaan Büchner-suppilolla. Alumiinioksidi kuivataan 105 °C:ssa vakiopainoon.

3.3 Pentyyliasetaatti, analyyssilaatua.

3.4 Pentanoli, analyyssilaatua (isomeerien seos on sopivaa).

3.5 Petrolietteri, kiehumisväli 40–60 °C.

3.6 Urealiuos. Sekoitetaan 90 g ureaa analyyssilaatua 100 ml:aan vettä, lämmitetään varovasti täydellisen liukenemisen varmistamiseksi.

3.7 Standardiaine: puhdas furatsolidoni.

3.8. Standardiliuos: punnitaan 0,1 mg:n tarkkuudella 25 mg standardiyhdistettä (3.7), liuotetaan asetoniin (3.1) 250 ml:n mittapullossa (4.1), täytetään merkkiin asetonilla (3.1) ja sekoitetaan. 1 ml tätä liuosta sisältää 100 µg furatsolidonia.

4 Välineistö

4.1 Ruskeaa lasia olevia 100 ja 250 ml:n mittapulloja.

4.2 Ruskeaa lasia olevia 100 ml:n erotussuppiloita.

- 4.3 Sopiva uuttolaite (esim. Soxhlet tai Twisselmann).
- 4.4 Uuttohylsyjä (25 x 80 mm tai 28 x 100 mm).
- 4.5 Lasisia kromatografiapylväitä, sisähalkaisija 10 mm, pituus 300 mm.
- 4.6 Höyryhaude.
- 4.7 Spektrofotometri ja 10 mm:n kyvetit.

5 Menettely

HUOM. Kaikki toimenpiteet on suoritettava himmennetyssä valaistuksessa.

5.1 Näytteen valmistus

Näyte jauhetaan niin, että se läpäisee kokonaisuudessaan 1 mm seulan (ISO R 565-suosituksen mukainen).

5.2 Uutto

Punnitaan hienoksi jauhettua ja homogenoitua näytettä milligramman tarkkuudella 5–20 g (joka ei sisällä enempää kuin 1 mg furatsolidonia) uuttohylsyyn (4.4) ja pannaan se uuttolaitteeseen (4.3). Uutetaan petrolieetterillä (3.5) varmistuen siitä, että Soxhlet-laitetta käytetään 13–17 tyhjennys- ja täyttöjaksoa; mikäli käytetään muita uuttolaitteita, tässä vaiheessa ei saa käyttää alle 30 minuutin aikaa. Hylsy poistetaan laitteesta, jäljelle jäänyt liuotin valutetaan pois ja hylsy ja uutettu rehu kuivataan lämpimässä ilmavirrassa.

Kuivattu hylsy ja sen sisältö asetetaan puhtaaseen uuttolaitteeseen ja uutetaan asetonilla (3.1) käyttäen Soxhlet-laitetta käytettäessä ainakin 25 tyhjennys- ja täyttöjaksoa. Uutto-olosuhteet täydellisen uuton aikaansaamiseksi millä tahansa laitteella on määrättävä ennakolta. Asetoniuute haihdutetaan 5–10 ml:n tilavuuteen höyryhauteella (4.6) ja jäähdytetään huoneenlämpöön.

5.3 Kromatografia

Kromatografiapylvään (4.5) alapäähän työnnetään lasivillatuppo ja se tasoitetaan sopivalla puikolla 2–3 mm:n paksuiseksi. Alumiinioksidi (3.2) -liete valmistetaan asetoniin (3.1), kaadetaan pylvääseen ja annetaan laskeutua. Valmiin pylvään korkeuden tulisi olla noin 200 mm. Asetonikerroksen annetaan laskeutua pylvään yläpinnan tasalle.

Siirretään 5.2 kohdan mukaisesti saatu asetoniuute pullosta pylvääseen, pullo huuhdotaan useita kertoja asetonilla (3.1) ja neste siirretään pylvääseen. Pylvään alle asetetaan sopiva pullo ja furatsolidoni eluoidaan asetonilla (3.1); käytetyn asetonin kokonaistilavuuden, mukaan lukien huuhteluun käytetyt erät, tulisi olla noin 150 ml.

5.4 Uutto ja absorbanssin mittaus

Asetonieluaatti (5.3) haihdutetaan kuivaksi höyryhauteella (4.6) (joskus voi jäädä jäljelle pieni määrä diasetonialkoholia, joka on syntynyt asetonin kondensaatiosta alumiinioksidissa, mutta tämä ei häiritse seuraavia uuttoja). Jäännös liuotetaan 10 ml:aan pentanolia (3.4) ja liuos kaadetaan erotussuppiloon (4.2). Tämä toimenpide toistetaan käyttäen huuhtelunesteinä 10 ml pentyyliasettaattia (3.3). Uuttojäännöksen sisältänyt astia huuhdotaan lopuksi 10 ml:lla urealiuosta (3.6), tämä lisätään erotussuppiloon ja ravistellaan voimakkaasti kahden minuutin ajan.

Faasiin annetaan erottua 3–4 minuutin ajan ennen kuin vesipitoinen faasi siirretään 100 ml:n mittapulloon (4.1). Huuhtelu- ja uuttovaiheet toistetaan vielä neljä kertaa 10 ml:lla urealiuosta (3.6) ja vesipitoiset uutteet pannaan mittapulloon. Mittapullon sisältö laimennetaan 100 ml:ksi urealiuoksella (3.6) ja homogenoidaan. Liuoksen absorbanssi mitataan spektrofotometrillä (4.7) 375 nm:ssä referenssikyvetissä olevaa urealiuosta (3.6) vastaan. Furatsolidonin määrä saadaan standardikäyrän (5.5) avulla.

5.5 Standardikäyrä

Valmistetaan kohdan 5.3 mukaisesti 4 kromatografiapylvästä. Kuhunkin pylvääseen pipetoidaan erikseen 2,5, 5, 7,5 ja 10 ml standardiliuosta (3.8). Kaikki neljä pylvästä pestään 150 ml:lla asetonilla (3.1) ja jatketaan kohdan 5.4 mukaisesti. Piirretään standardikäyrä käyttäen absorbanssin arvoja ordinaattana ja vastaavia migrogrammoina annettuja furatsolidonin määriä abskissa-ana.

6 Tulosten laskeminen

Näytteen furatsolidonipitoisuus milligrammoina kilogrammaa kohti saadaan kaavasta:

$$\frac{A}{P}$$

jossa:

A = fotometrisellä mittauksella saatu furatsolidonin määrä mikrogrammoina.

P = näytteen punnitus grammoina.

7 Toistettavuus

Samasta näytteestä tehtyjen kahden rinnakkaisen määrittelyn tulosten välinen ero ei saa ylittää:

50 %, suhteessa suurempaan tulokseen, furatsolidonipitoisuuksien ollessa välillä 10–20 mg/kg.

10 mg/kg, absoluuttisesti ilmoitettuna, pitoisuuksien ollessa välillä 20–100 mg/kg.

10 %, suhteessa suurempaan tulokseen, pitoisuuksien ollessa 100–5 000 mg/kg.

500 mg/kg, absoluuttisesti ilmoitettuna, pitoisuuksien ollessa välillä 5 000–10 000 mg/kg.

5 %, suhteessa suurempaan tulokseen, pitoisuuksien ollessa yli 10 000 mg/kg.
